ULTRASTRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN AM GAUMEN-EPITHEL VON MÄUSEFETEN WÄHREND DER NORMALEN PALATOGENESE SOWIE BEI EXPERIMENTELL HERVORGERUFENEN GAUMENSPALTEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
RAINER M. AICHINGER-HINTERHOFER
aus Bardenberg/Aachen

Bonn 1976

ULTRASTRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN AM GAUMEN-EPITHEL VON MÄUSEFETEN WÄHREND DER NORMALEN PALATOGENESE SOWIE BEI EXPERIMENTELL HERVORGERUFENEN GAUMENSPALTEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
zu Bonn

vorgelegt von
RAINER M. AICHINGER-HINTERHOFER
aus Bardenberg/Aachen

Bonn 1976

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter : Prof. Dr. med. G. Schlüter
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. E. Krüger

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Bonn

Direktoren: Prof.Dr. K. Fleischhauer
Prof.Dr. H. Wartenberg

Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Schl. 166/1)

Druck: R. Schwarzbold, 5305 Witterschlick/Bonn

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

meiner Mutter

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523714_0050

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
Einleitung	6
Material und Methode	
1. Tiere, Tierhaltung und Bestimmung des Konzeptionstermins	9
2. Versuchsgruppen	9
3. Präparationstechnik, Fixierung und Einbettung der Keime	11
4. Schneidetechnik und Schnittfärbung	12
5. Elektronenmikroskopie	12
Befunde	
1. Der normale Gaumenschluss	14
2. Der experimentell gestörte Gaumenschluss	25
a. Teratologische Befunde	
b. Feinstrukturelle Befunde	
Diskussion	36
Zusammenfassung	40
Literaturverzeichnis	41

EINLEITUNG

Der durch zahlreiche experimentelle Untersuchungen belegte Befund, daß bei Laboratoriumstieren eine Vit. A-Hypervitaminose stark teratogen wirkt (Zusammenfass. Lit. siehe bei Kalter und Warkany, 1959) spielt möglicherweise auch bei der Entstehung menschlicher Mißbildungen eine Rolle. So berichten Pilotti und Scorta (1965) über Mißbildungen bei menschlichen Keimen nach hoher maternaler Vit. A Gabe im 1. Embryonalmonat. Gal et al. (1972) fanden bei mißgebildeten menschlichen Feten sowohl eine erhöhte Vitamin A-Konzentration im maternalen Serum wie auch in der fetalen Leber. Eine stark erhöhte Vitamin A-Konzentration, die normalerweise um 30 - 50 ug/ml Plasma (Russel et al., 1973) liegt, tritt z.B. infolge verminderter Speicherungsfähigkeit der Leber bei Cirrhose oder nach Intoxikation der Hepatozyten durch CCl_4 auf (Baker und Frank, 1968).

Bei Applikation von Vit. A an trächtige Nager um den 12. Tag werden bei den Feten unter den auftretenden Mißbildungen in einem hohen Prozentsatz Gaumenspalten beobachtet (Giroud et al., 1955, 1956; Kalter, 1960; Wollam und Millen, 1958, 1960). Dabei ist die Frage, auf welche Weise die Hypervitaminose Gaumenspalten hervorruft und wo ihr primärer Angriffspunkt zu suchen ist, bisher noch weitgehend ungeklärt.

Bei der normalen Morphogenese des sekundären Gaumens lassen sich 2 Phasen voneinander abgrenzen. Zunächst kommt es zu einer Bewegung der Gaumenfortsätze aus der vertikalen in die horizontale Ebene (Peter, 1924; Lazzaro, 1940; Walker und Fraser, 1956; Asling et al., 1960; Zeiler et al., 1964; Coleman, 1965), in der zweiten Phase kommt es zu einer Vereinigung der Gaumenfortsätze untereinander und mit dem Septum nasale (Pourtois, 1967; Vargas, 1967; Farbman, 1968; Sweney und Shapiro, 1970).
Smiley und Koch teilen den eigentlichen Übergang der Fusion in verschiedene Abschnitte: epithelialer Kontakt, epitheliale Adhärenz, epithelialer Abbruch und schließlich mesenchymale Fusion.

Aus dieser Einteilung geht die wichtige Rolle des Epithels der Gaumenfortsätze hervor. Es besitzt nämlich die Fähigkeit, den ersten Kontakt herzustellen und bereits einen so stabilen Zusammenhalt zu gewährleisten (Pourtois, 1966, 1968; Vargas, 1967; Farbman, 1968), daß die Gaumenfortsätze experimentell nur schwer wieder zu trennen sind (Zeiler et al., 1964; De Angelis und Nalbadian, 1968; Farbman, 1968).

Während als Ursache der zunächst epithelialen Adhäsionsfestigkeit desmosomale Kontakte aufgrund ihrer geringen Zahl weitgehend zu vernachlässigen sind (Farbman, 1968, 1969; Hayward, 1969; Smiley und Koch, 1971), scheint nach neueren Untersuchungen (Greene und Kochhar, 1974; Souchon, 1975) das Auftreten eines Oberflächenfilms auf den Epithelzellen zum Zeitpunkt ihrer Aufwärtsbewegung eine wesentliche Rolle zu spielen. Mit Hilfe von an Meerrettich-Peroxidase gebundenem Concanavalin A, einem kohlehydratbindenden Protein, beobachteten nämlich erstmals Pratt et al. (1973) ein Reaktionsprodukt an der Oberfläche der fusionierenden Epithelabschnitte. Greene und Kochhar (1974) gelang es bei Mäusefeten unter Verwendung von Rutheniumrot (RR) (Luft, 1971a, b) das saure Mukopolysaccharid, Glucosaminoglycane (G A G) und Proteoglycane (P G) markiert und elektronenmikroskopisch sichtbar macht (Gustavson und Pihl, 1967; Merker und Struwe, 1971; Myers et al., 1969), einen RR-positiven surface coat nachzuweisen, der etwa 48 Stunden vor der Horizontalisierung der Gaumenfortsätze erscheint. Das zeitliche Zusammentreffen im Auftreten des Oberflächenfilms mit dem Erwerb der Fusionsfähigkeit (Pourtois, 1966; Vargas, 1967) weist auf die wichtige Rolle des Oberflächenfilms beim epithelialen Schluß des sekundären Gaumens hin. Zum gleichen Ergebnis wie Greene und Kochhar (1974) kommt auch Souchon (1975), der ebenfalls RR als Indikator verwandte. Er konnte zusätzlich nachweisen, daß der RR-positive Oberflächenbelag an der Spitze der vertikal herabhängenden und der horizontalisierten Gaumenfalten dicker und dichter ist als an der übrigen Oberfläche der Gaumenfortsätze und während der Fusion abgestoßen wird. Um die Bedeutung des surface coat weiter abzuklären, wurde in der vorliegenden

Arbeit untersucht, ob bei Vit. A induzierten Gaumenspalten Veränderungen am surface coat der nicht fusionierenden Gaumenfortsätze zu beobachten sind.

MATERIAL UND METHODE

1. Tiere, Tierhaltung und Bestimmung des Konzeptionstermins:

Die Untersuchungen wurden an Mäusen des NMRI/HAN-Stammes (Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover) durchgeführt. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum (Temperatur 24 °C, relative Luftfeuchtigkeit 70 %, bei konstantem Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden) gehalten. Während die weiblichen Tiere in Gemeinschaftskäfigen untergebracht waren, wurden die Böcke in Einzelkäfigen gehalten. Futter (Trockenpellets, Firma Höfeler) und Wasser erhielten alle Tiere ad libitum. Zur Bestimmung der Trächtigkeit wurden jeweils abends gegen 18 Uhr zwei Weibchen mit einem Bock zusammengesetzt. Am folgenden Morgen zwischen 8 und 9 Uhr wurden die Weibchen auf das Vorhandensein eines Vaginalpfropfes untersucht. Beim Nachweis eines Pfropfes wurden die Tiere als trächtig angesehen und der Tag des Pfropfnachweises als erster Trächtigkeitstag gerechnet. Die Tiere, bei denen ein Pfropf nicht nachweisbar war, wurden frühestens 5 Tage später erneut gepaart, um Fehlberechnungen der Tragzeit weitgehend auszuschalten; denn gelegentlich werden Tiere auch befruchtet, ohne daß sich ein Vaginalpfropf ausbildet.

2. Versuchsgruppen:

Die Zahl aller Versuchstiere und ihre Verwendung im Rahmen dieser Untersuchung sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

a. Normaltiere

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung des Gaumenschlusses wurden die Feten unbehandelter Muttertiere zwischen dem 15. und 16. Trächtigkeitstag herangezogen, da bei Mäusekeimen der Gaumenschluß im Laufe des 15. Trächtigkeitstages erfolgt (Greene und Kochhar, 1974).
Die als Kontrolle im Rahmen der teratologischen Versuche verwendeten Feten wurden am 19. Trächtigkeitstag -

1 Tag vor dem Wurftermin - schnittentbunden und nach der im folgenden Abschnitt angegebenen Weise untersucht.

b. Versuchstiere

Um genaue Anhaltspunkte für die t e r a t o g e n e Wirkung hoher Vit. A-Dosen vor allem im Hinblick auf die Entstehung von Gaumenspalten zu erhalten, wurde zunächst den Muttertieren an drei aufeinanderfolgenden Tagen, nämlich am 12., 13. und 14. Trächtigkeitstag, Vitamin A (Avicotrat ^{R}, Heyl) subcutan in einer Dosierung von je 17.500 bzw. 25.000 IE appliziert. Um bei der Untersuchung auf embryotoxische und teratogene Wirkungen eine Beurteilung der Feten zum jeweils gleichen Trächtigkeitszeitpunkt und eine Inspektion der Placenten und der Implantationsstellen zu ermöglichen, wurden alle Tiere am 19. Trächtigkeitstag - einen Tag vor dem Wurftermin - schnittentbunden. Um nichts zu übersehen, wurden die Feten stets in der gleichen Weise inspiziert: Kopf, Rücken, Hals, rechte und linke Körperseite, Bauch, Vorderbeine, Hinterbeine, Genitalien und Schwanz, alle dabei feststellbaren Veränderungen wurden notiert. Besondere Beachtung fanden Zeichen der Lebensäußerung und bereits makroskopisch erkennbare Mißbildungen. In den beiden Uterushörnern, die zur besseren Beurteilung herauspräpariert wurden, wurden die beiderseitigen Implantationsstellen gezählt und mit der Anzahl der Feten verglichen, um die Zahl der Resorptionen zu ermitteln. Um neben makroskopisch sichtbaren Veränderungen auch solche am Knochensystem sichtbar zu machen, wurden die Feten, nachdem sie in Aether getötet worden waren, nach der Methode von Dawson (1926) geklärt und gefärbt. Genauere Einzelheiten über den Ablauf des Klärungsvorganges, sowie die Auswertung der Veränderungen und ihre Zuordnung zu Retardierungen oder Mißbildungen finden sich bei Schlüter (1974).

Bereits die ersten Versuchsergebnisse zeigten, daß nach Applikation der genannten Dosen bei allen Feten Gaumenspalten auftraten und damit die Phase der Palatogenese mit Sicherheit gestört ist.

Für die e l e k t r o n e n m i k r o s k o p i s c h e Untersuchung zur Ermittlung feinstruktureller Veränderungen des Gaumenepithels während dieser Entwicklungsphase wurden daher ebenso wie bei den Kontrolltieren Feten zwischen dem 15. und 16. Trächtigkeitstag herangezogen.

3. Präparationstechnik, Fixierung und Einbettung der Keime:

Für die elektronenmikroskopische Aufarbeitung der Feten während der Phase der Palatogenese wurden die Muttertiere mit Aether narkotisiert, anschließend laparotomiert und die vorgelagerten Uterushörner eröffnet. Nachdem die Feten vorsichtig von dem sie umhüllenden Dottersack und Amnion befreit waren, wurden sie zunächst in eine modifizierte Karnovsky-Lösung (2 % Paraformaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd in 0,2 M Cacodylatpuffer, pH 7,4) verbracht. Nach kurzer Anfixierungszeit von ca. 30 Minuten, in denen die Keime weitgehend vorgehärtet sind, wurde jeweils vorsichtig der Kopf abgesetzt, ein Teil der Schädelkalotte und des Unterkiefers entfernt und die Keime in frische Fixierlösung verbracht. Ein Teil dieser Tiere wurde - randomisierend - in eine Karnovsky-Lösung der oben erwähnten Konzentration verbracht, der zusätzlich 0,09 % Rutheniumrot zur Darstellung des surface coat's zugesetzt war.
Nach einer Fixierungszeit von ca. drei Stunden wurden die Präparate zunächst unter mehrmaligem Waschen in 0,2 M Cacodylatpuffer (unter Zusatz von 3 % Succhrose) für etwa eine Stunde gespült und anschließend in einer 1,3 % OS O_4-Lösung in 0,2 M Cacodylat für weitere drei Stunden nachfixiert. Bei den in rutheniumrothaltiger Karnovsky-Lösung fixierten Keimen erfolgte die Nachfixierung in 1,3 % OS O_4 unter Zusatz von 0,04 %

Ruthenium rot.
Nach der Entwässerung in Aethanol steigender Konzentration erfolgte die Einbettung aller Präparate über Propylenoxyd in Durcupan (Araldit, Fluka).

4. Schneidetechnik und Schnittfärbung:

Von allen Präparaten wurden Semi- und Ultradünnschnitte auf dem Mikrotom OMU_3 der Firma Reichert hergestellt. Vor dem Zutrimmen der Blöckchen für die Anfertigung von Ultradünnschnitten wurden zunächst 1 μ dicke Schnitte in frontaler Schnittrichtung angefertigt, bis die Region des sekundären Gaumens erreicht war. Diese Schnitte wurden mit Toluidinblau-Pyronin nach der Methode von Ito und Winchester (1963) angefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicetrat nach Reynolds (1963) in der Modifikation nach Mollenauer (1965) kontrastiert. Bei allen Präparaten, die in Rutheniumrot fixiert worden waren, wurden jeweils auch unkonstrastierte Schnitte durchmustert.

5. Elektronenmikroskopie:

Die Ultradünnschnitte wurden mit den Elektronenmikroskopen von Zeiss (E M 9 S 2) und Philips (E M 3 O 1) bei Primärvergrößerungen zwischen 1.500 und 100.000 fach betrachtet und fotografiert.

Gruppe	Vit.A-Dosis pro Tag (I.E.)	Behandlungstage	Schnittentbindung (Trächtigkeitstag/-stunde)	Zahl der Muttertiere	Zahl der Feten	Verwendung der Feten
I	25.000	12.,13.,14.	19/ 2 - 6	4	40	Teratologie
	25.000	12.,13.,14.	15/ 2 -12	3	21	Elektronenmikroskopie
II	17.500	12.,13.,14.	19/ 2 - 6	7	56	Teratologie
	17.500	12.,13.,14.	16/ 4 - 8	2	26	Elektronenmikroskopie
Ko	-	-	19/ 2 - 6	7	104	Teratologie
	-	-	15.; 16.	10	136	Elektronenmikroskopie

Tab. 1: Untersuchungsgruppen und ihre Verwendung

BEFUNDE

1. Der normale Gaumenschluß:

Die Abbildungen 1a - d zeigen zunächst die verschiedenen Stadien des Gaumenschlusses, die in der vorliegenden Untersuchung berücksichtigt wurden. In der Abbildung 1a ist zu erkennen, daß die beiden zipflig ausgezogenen Palatinalfortsätze noch senkrecht neben der Zunge herabhängen und den Bereich zwischen Zungengrund und der späteren Wangenregion ausfüllen. In dem in Abbildung 1b dargestellten Stadium hat bereits einer der Fortsätze seine vertikale Position verlassen und nach Vorbeigleiten an der Zunge eine waagerechte Stellung eingenommen. Der andere Fortsatz weist dagegen noch die gleiche topographische Lagebeziehung wie in dem des Stadiums 1 auf. In der Abbildung 1c sind beide Fortsätze horizontalisiert, sie können unterschiedlich weit oberhalb der Zunge und in unterschiedlicher Nähe zum Nasenseptum angetroffen werden. Die Abbildung 1d schließlich zeigt die beginnende Fusion. Die Epithelschichten sind in ihrer Höhe und klaren Abgrenzungen gegenüber dem tieferliegenden Mesenchym bereits verändert, der epitheliale Charakter dieser Zellen ist aber auch im lichtmikroskopischen Bild noch zu erkennen.

In der Abbildung 2, in der bei stärkerer lichtmikroskopischer Vergrößerung der noch senkrecht herabhängende Palatinalfortsatz zu erkennen ist, sind die Regionen eingezeichnet, die für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen herangezogen wurden; nämlich die nasale bzw. orale Seite sowie die Spitze des Palatinalepithels.

Im elektronenmikroskopischen Bild ist bereits bei Übersichtsvergrößerung (Abbildung 3) zu erkennen, daß die Peridermschicht des Gaumenfortsatzes in ganzer Ausdehnung und während aller untersuchten Stadien aus drei, gelegentlich auch zwei Zellagen aufgebaut wird. Dabei vollzieht sich der Wechsel vom zwei- zum

Abb. 1 a-d: Übersicht über die charakteristischen Stadien des Gaumenschlusses bei der Maus. Einzelheiten im Text.

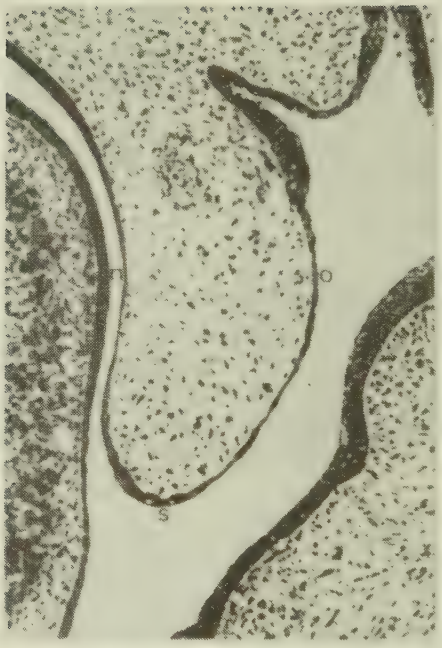


Abb. 2: Semidünnschnitt eines Palatinalfortsatzes zur Erklärung der untersuchten Regionen:
O orale Seite, N nasale Seite, S Spitze des Fortsatzes.
Färb.: Toluidinblau-Pyronin, Vergr. 11ofach.

dreischichtigen Epithelbelag vor allen Dingen im Bereich der Spitze des Palatinalfortsatzes. Die Zellen der basalen Zellschicht, die bereits einer gut ausgebildeten Basalmembran unmittelbar aufsitzen, sind in der Regel rundlich bis oval gestaltet, der ovale Zellkern nimmt eine mittelständige Lage ein. In der mittleren Zellschicht werden die Zellen bereits flacher, die Zellkerne sind vor allen Dingen an den Enden ausgezogen und die Interzellularräume zwischen benachbarten Zellen werden größer. Die oberflächliche Zellage der Periderm-schicht schließlich besteht aus sehr flachen, plattenähnlichen Zellindividuen, die häufig zwei oder drei der tieferen Zellen girlandenförmig überspannen. Unter diesen Zellen fallen regelmäßig einige durch ihre erhebliche Elektronendichte auf. Während die zeltartig ausgebreiteten Zellen der oberflächlichen Zellage regelmäßig durch typische Schlußleistenkomplexe, bestehend aus Zonula occludens, Zonula adhaerens und Desmosom (Farquhar und Palade, 1963) verbunden sind, die eine Abdichtung des embryonalen Epithelverbandes gegenüber der Amnionhöhle darstellen, finden sich zwischen den Zellen der mittleren und basalen Schicht rein desmosomale Kontaktregionen in unterschiedlicher Häufigkeit (Abb. 4). Gegen die Basalmembran bildet das basale Plasmalemm der tiefen Schicht sehr häufig Konfigurationen aus, die an Halbdesmosomen erinnern.
Allen Zellschichten gemeinsam ist die große Menge freier Ribosomen, die in vorwiegend polyribosomaler Anordnung vorliegen, dagegen tritt die Zahl der Schläuche des rauhen endoplasmatischen Retikulums weitgehend zurück. Der aus zahlreichen, jedoch weitgehend abgeplatteten Säckchen bestehende Golgi-Komplex nimmt in der Regel eine peri- oder supranucleäre Lage ein, die Zahl der sich an den Enden abschnürenden Bläschen ist jedoch gering. Die Mitochondrien sind vorwiegend oval, gelegentlich aber auch länglich oder winklig gestaltet, die Zahl der Cristae ist gering, die Matrix ist vor allen Dingen in der Basal- und mittleren Zellschicht elektronendicht. In den flachen Zellelementen der Peridermschicht erscheinen die Mitochondrien häufig stark gebläht, die Zahl der Cristae reduziert und die Matrix

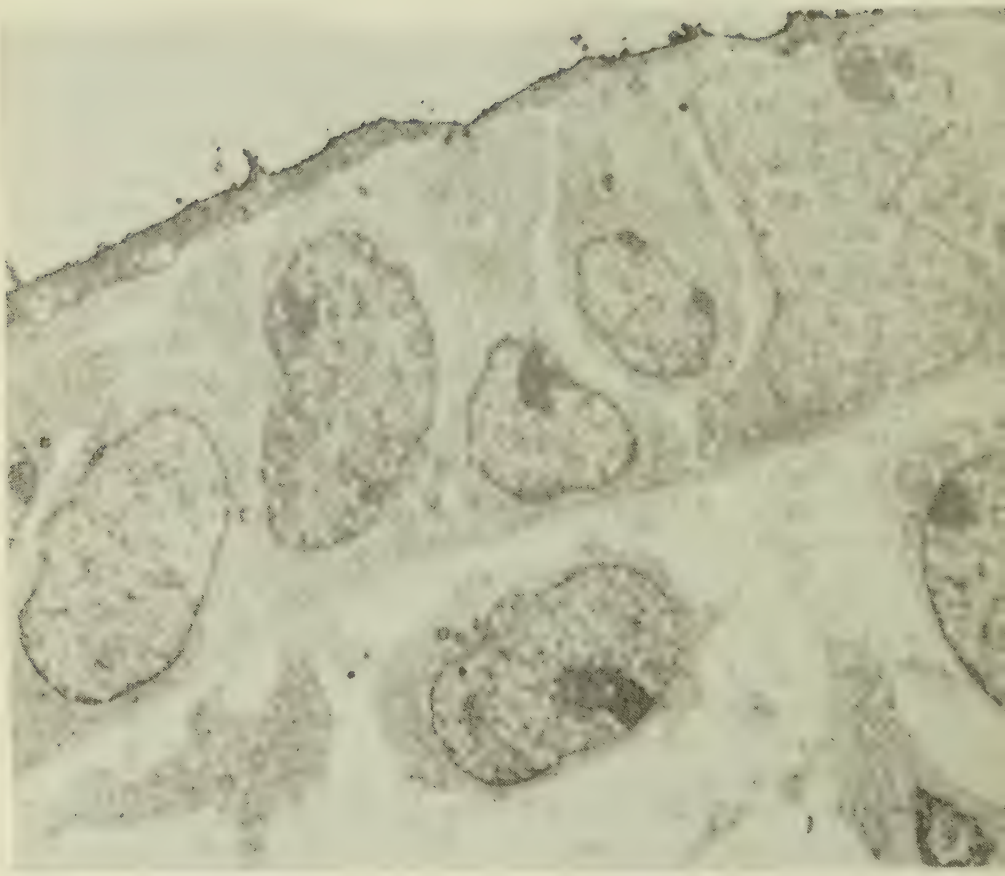


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Übersicht des Palatinalepithels auf der oralen Seite. Zweischichtiges embryonales Epithel. Nach Inkubation in Ruthenium-Rot (RR) deutliche Darstellung des Oberflächenfilms. Primärvergrösserung 4.500fach.

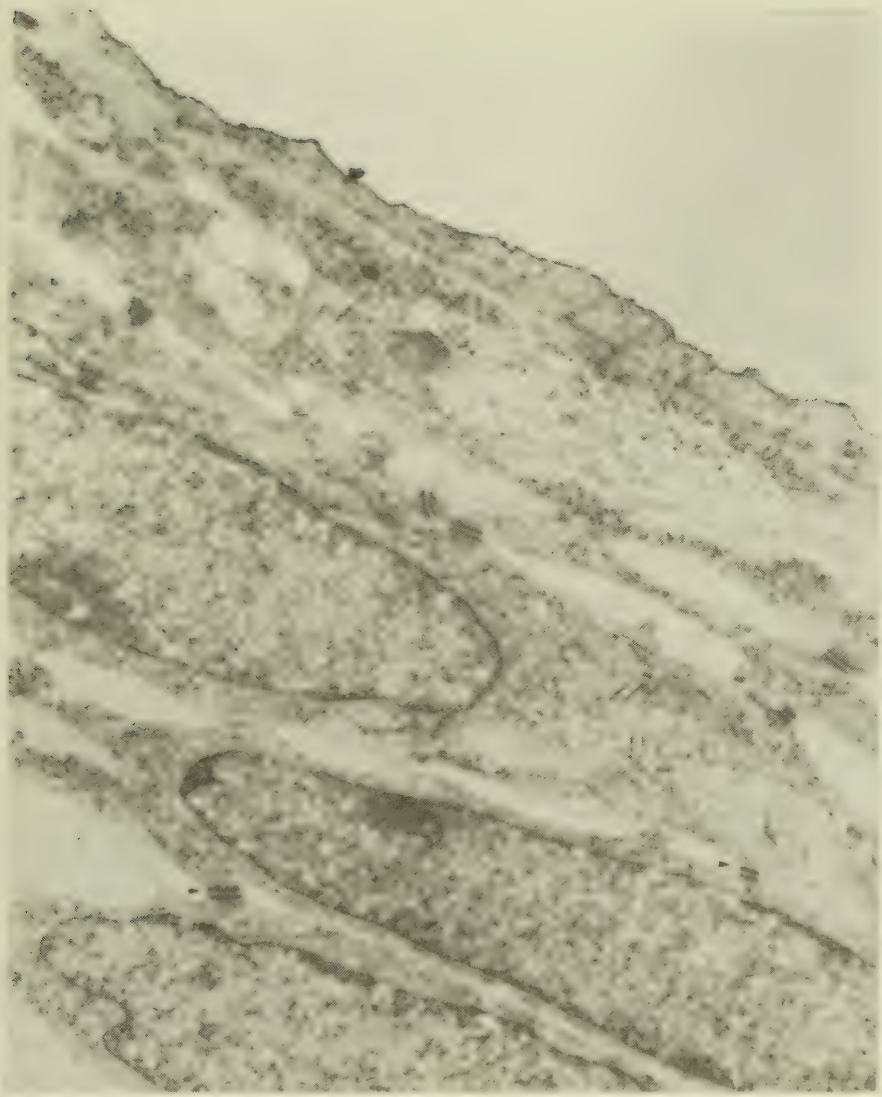


Abb. 4: Stärkere Vergrößerung des Palatinalepithels im Bereich der Spitze. Apikale Zellverbindungen durch Schlußleistenkomplexe, in den tieferen Schichten finden sich typische Desmosomen (►). Primärvergrößerung ca. 8.000fach.

elektronendicht. Mit fortschreitendem Entwicklungsalter lassen sich vor allen Dingen an den Zellen der oberflächlichen, gelegentlich aber auch der mittleren Zellschichten, augenfällige Veränderungen feststellen. In diesen Zellen erscheinen jetzt regelmäßig große Bezirke von Glykogenansammlungen, die besonders in den Zellen der oberflächlichsten Zellschicht mehr als die Hälfte des Zytoplasmas einnehmen.
Nach Fixation in RR läßt sich bei allen Feten von Muttertieren der Kontrollgruppe bis kurz vor Beginn der epithelialen Fusion schon bei Übersichtsaufnahmen ein Rutheniumrot (RR) -positiver Oberflächenfilm nachweisen (Abb. 3). Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 5) erscheint dieser als ein ca. 600-800 Å dicker coat aus feingranulärem, bisweilen auch filamentärem Material, der am äußeren Blatt des dreischichtigen Plasmalemms dicht aufliegt. Dieser surface coat erstreckt sich dabei auf der Oberfläche der Peridermschicht bis zum Bereich der Schlußleistenkomplexe, wobei durch die Zonula occludens das Eindringen des RR in die Interzellularspalten verhindert wird (Abb. 6). Dieser surface coat dehnt sich über die gesamte Peridermschicht der Palatinalfortsätze aus, wobei keine quantitativen oder qualitativen Unterschiede zwischen späterer oraler und nasaler Seite festzustellen sind.

Erst zum Zeitpunkt des beginnenden epithelialen Kontaktes lassen sich ultrastrukturelle Veränderungen sowohl an den Epithelzellen als auch am coat erkennen. Als epitheliale Membranspezialisierung kommt es zum Auftreten kürzerer oder längerer Mikrovilli, die zwischen den Zellen der Fortsätze im Bereich des epithelialen Kontaktes Interdigitationen auszubilden beginnen. Der surface coat wird in diesem Stadium gelegentlich vollständig abgestoßen, häufiger dagegen bedeckt er die Oberfläche in Form von großperligen Strukturen, wobei zwischen den einander gegenüberliegenden Zellmembranen feinfädige RR-positive Strukturen den Spaltraum zwischen den Fortsätzen durchqueren und brückenartig den Fusionsbereich überspannen (Abb. 7).
Diese RR-positiven Granula lassen sich auch noch nach Ablauf

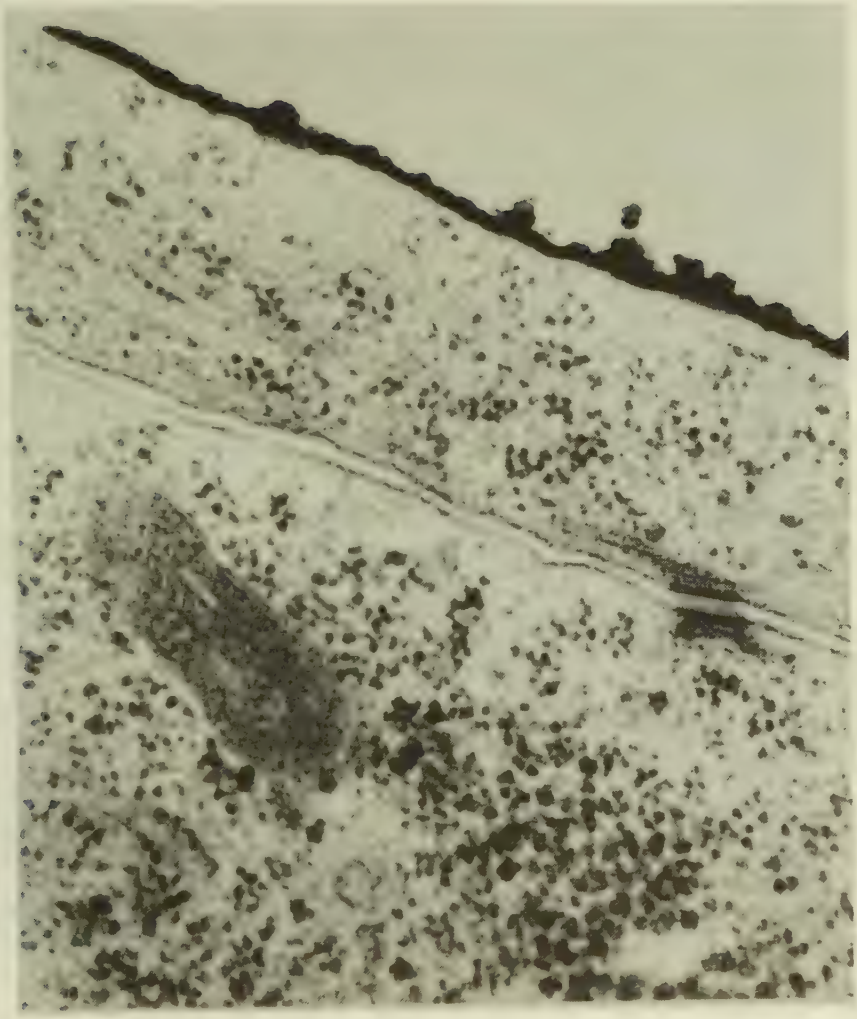


Abb. 5 : Ausschnitt aus dem Periderm nach PP-Inkubation. Bei höherer Auflösung besteht der surface coat aus einem bis zu 800 Å dicken, vorwiegend granulären Material, das dem äußeren Blatt des dreischichtigen Plasmalemms aufsitzt. Primärvergrößerung 70.000fach.

Abb. 6: Typischer Schlußleistenkomplex im Bereich der oberflächlichen Zellschicht des Periderm, der das Eindringen von RR in den Interzellularspalt verhindert. Primärvergrößerung 98.000fach.

Abb. 7: Palatinalepithel kurz vor Vereinigung der beiden Gaumenfortsätze. Der RR-markierbare Oberflächenfilm befindet sich überwiegend in perliger Ablösung. Bei > überspannt RR-positives Material den zwischen beiden Fortsätzen gelegenen Raum. Primärvergrößerung 10.000fach.

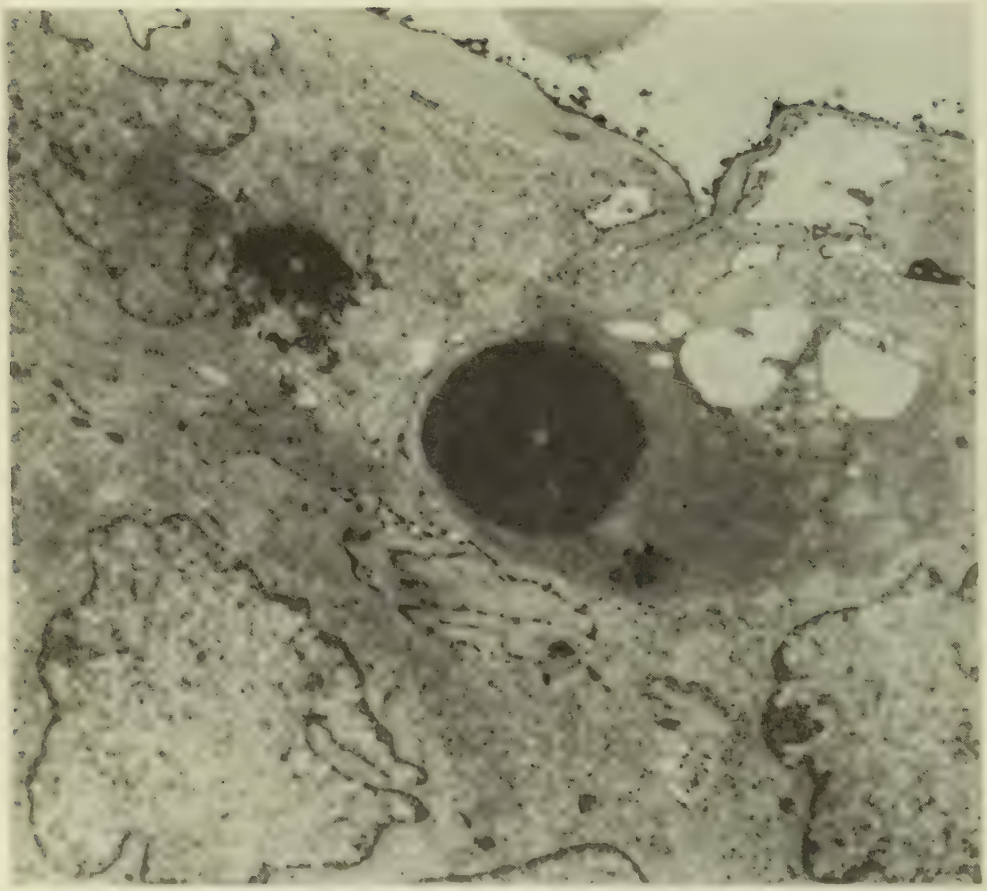


Abb. 8: Epithelialer Fusionsbereich mit nekrotischen Zelltrümmern (o), die bei x bereits phagozytiert worden sind. In den Interzellularräumen Darstellung von PR-positivem Material. Primärvergrößerung 18.000fach.

der epithelialen Fusion in mehr oder weniger großer Anzahl im I C S erkennen, wie die Abbildung 8 zeigt. Wie die Abbildung weiterhin zeigt, kommt es zu diesem Zeitpunkt erstmals auch zum vermehrten Auftreten stark osmiophil gefärbter nekrotischer Zellen, die entweder von benachbarten Epithelzellen oder von bereits einwandernden Makrophagen phagozytiert und lysosomal abgebaut werden.

2. Der experimentell gestörte Gaumenschluß:

a. Teratologische Befunde:

Wie aus der Tabelle 2 zu erkennen ist, wiesen nach maternaler Applikation von je 17.500 bzw. 25.000 IE Vitamin A am 12., 13. und 14. Trächtigkeitstag alle am 19. Tag schnittentbundenen Tiere Gaumenspalten auf. Darüberhinaus zeigten diese Feten makroskopisch folgende weitere Mißbildungen (Tabelle 3): Geringe Körpergröße, ausgeprägte Veränderungen im Bereich des Gesichtsschädels, Mißbildungen der Extremitäten und eine deutliche Kyphose der BWS. Zudem ist nach Skelettfärbung mit Alizarinrot S deutlich das Fehlen von KN im Bereich des sekundären Gaumens, sowie weiterer Knochenkerne der Schädelbasis zu erkennen.

b. Feinstrukturelle Befunde:

Die histologische Untersuchung eines durch eine Gaumenspalte mißgebildeten Keimes läßt im Bereich des sekundären Gaumens die fehlende Vereinigung der Palatinalfortsätze miteinander bzw. dem Nasenseptum erkennen (Abb. 9a). Wie die Abbildung 9b aber zeigt, unterscheidet sich die Palatogenese solcher Feten von der normaler Keime zunächst nicht, da in beiden Fällen eine Horizontalisierung erfolgt. Dieses Stadium jedoch wird lediglich etwa 12 Stunden später erreicht. Auch lassen sich bei diesen Tieren licht- und elektronenmikroskopisch keine Veränderungen

Gruppe	Vit.A-Dosis pro Tag (I.E.)	Behandlungstage	Tag der Schnittentbindung	Zahl d. Muttertiere	Zahl d. Implantationen	Zahl d. Feten	Zahl d. Resorptionen	% zur Implantationszahl	Zahl d. mißgebildeten Feten	% zur Zahl d. Feten
I	25.000	12.13.14.	19.	4	57	40	17	30,0	40	100
II	17.500	12.13.14.	19.	7	82	56	26	29,1	56	100
Ko	-	-	19.	7	113	85	28	24,7	0	0

Tab. 2: Embryotoxische Wirkungen und Häufigkeit von Gaumenspalten bei Mäusefeten in Abhängigkeit von der s.c. applizierten Vitamin-A-Dosis.

Gruppe	Vit.-A-Dosis I.E. pro Tag (12.13.14.)	Zahl d. Feten	Zahl d. mißgebildeten Feten	Art und Häufigkeit der Mißbildungen: Gaumenspalten	fehlende Schädelknochen	Mikrogenie	Mißbildungen der Extremitäten	Mißbildungen der WS. Rippen
I	25.000	40	40	40	-	? x	12	40
II	17.500	56	56	56	4	11	15	11

x Unterkiefer vor der Mazeration bereits abgesetzt

Tab. 3: Art und Häufigkeit der Mißbildungen

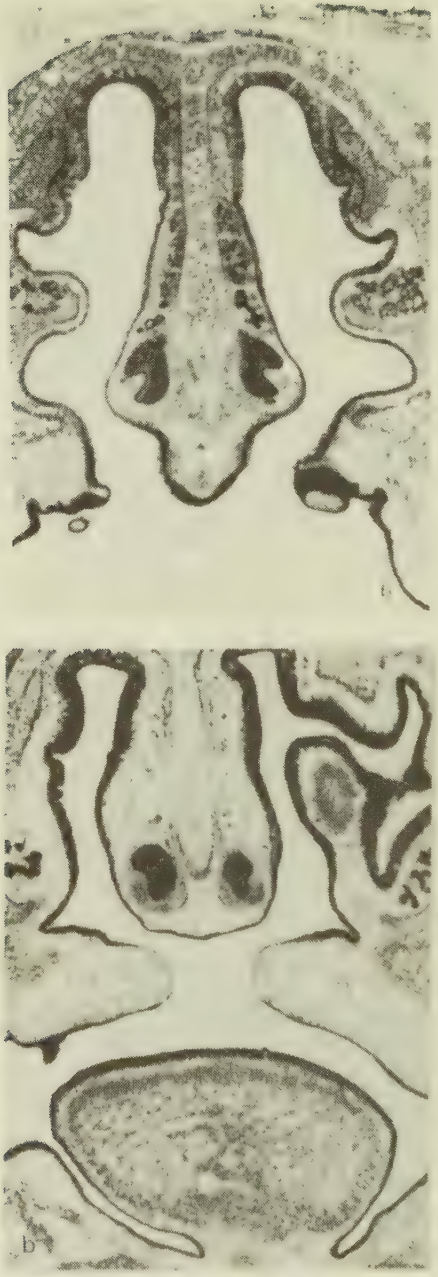


Abb. 9 a und b: Frontalschnitt in Höhe der Gaumenregion von Feten nach maternaler Vit.A-Applikation. In a typische Gaumenspalte bei einem 18 Tage alten Fet, in b sich entwickelnde Gaumenspalte bei einem 14 Tage alten Keim. Färb.: Toluidinblau-Pyronin, Verg. 15fach.

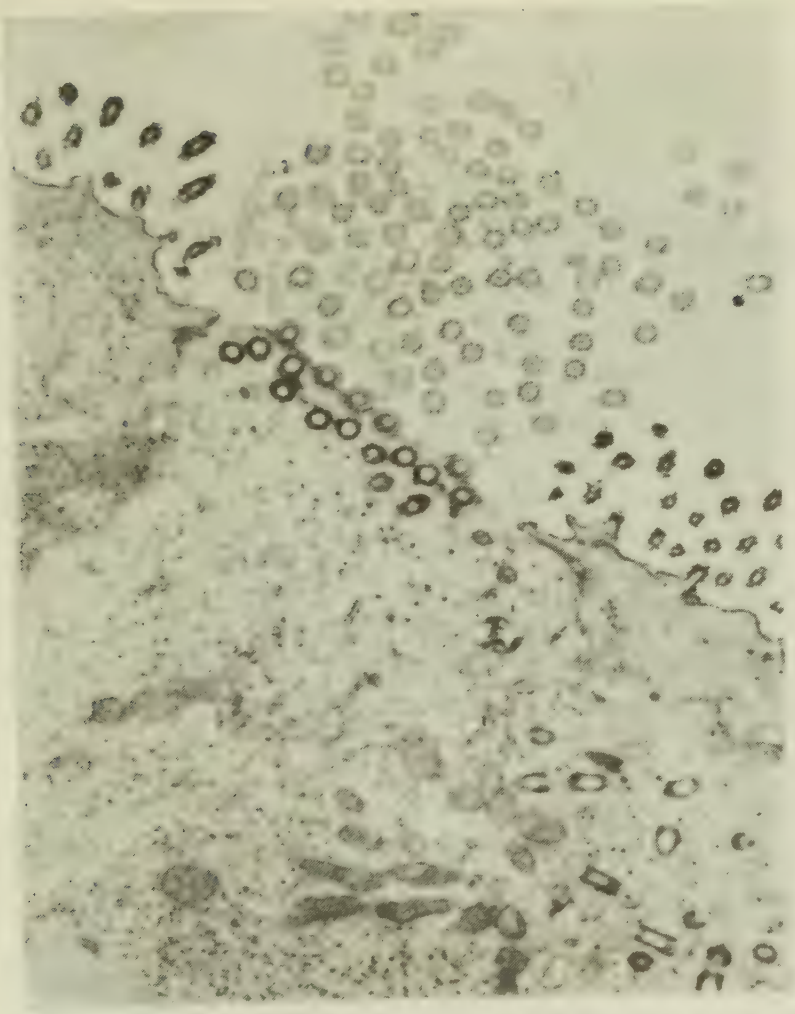


Abb.1o: Ausschnitt aus der nasalen Teil des Gaumenepithels eines Keimes mit sich entwickelnder Gaumenspalte. Differenzierung in Zilien- und mikrovillitragende Epithelzellen.
Primärvergrößerung 4o.ooofach.

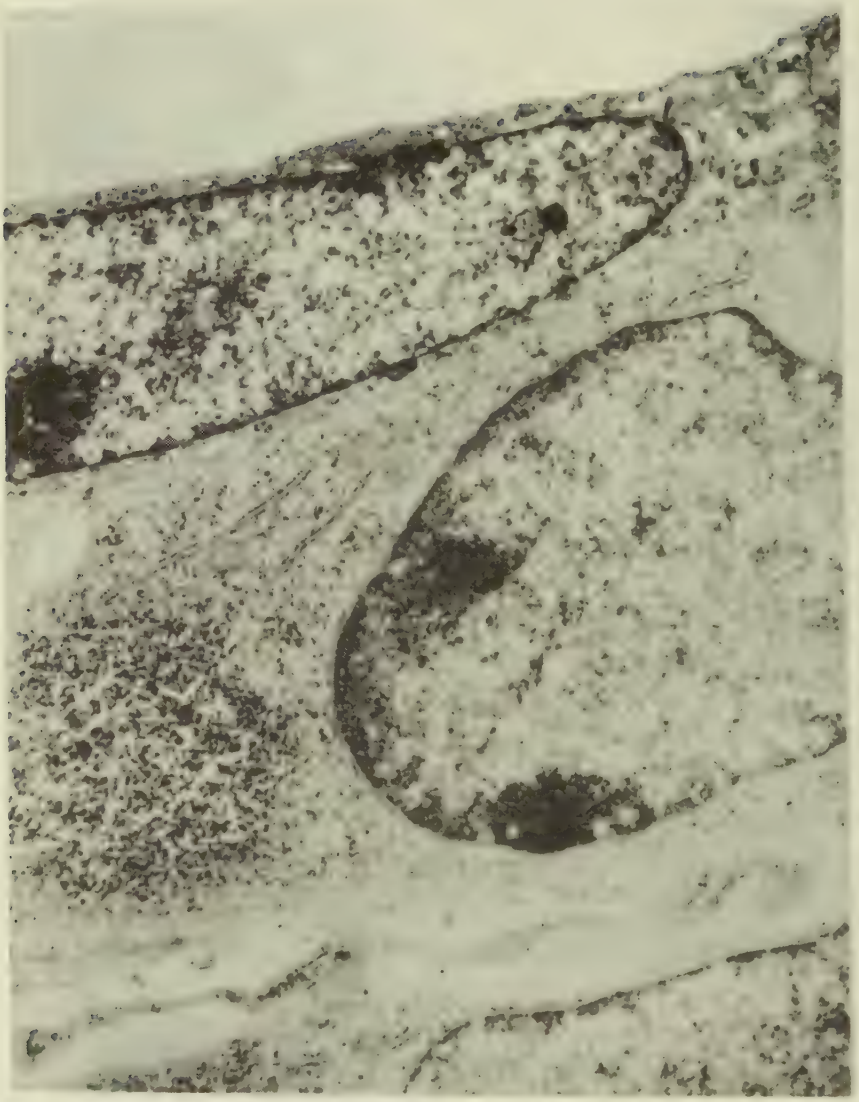


Abb. 11: Völliger Verlust des RR-markierbaren Oberflächenfilms bei einem Keim mit sich entwickelnder Gaumenspalte.
Primärvergrößerung 25.000fach

im Bereich der Palatinalfortsätze gegenüber Normalfeten feststellen, die für die Fehlentwicklung verantwortlich gemacht werden können: So laufen z.B. die Zytodifferenzierungsvorgänge der nasalen Epithelschicht zum respiratorischen Epithel in Form von zilientragenden Zellen weiter (Abb. 10).

Der RR-markierbare surface coat aller Feten, die durch Gaumenspalten gekennzeichnet sind, erscheint dagegen deutlich verändert. Er ist entweder völlig verschwunden (Abb. 11) oder deutlich verringert. Dies ist besonders bei einer Gegenüberstellung des coat's eines Normaltieres mit dem eines experimentellen Tieres zu erkennen (Abb. 12a u. b). Sowohl der Verlust der Homogenität, als auch die Verringerung der Höhe kennzeichnen den coat eines solchen experimentellen Tieres. Neben diesen quantitativen und qualitativen Veränderungen des surface coat ist bei solchen mißgebildeten Keimen häufig noch eine weitere Veränderung im Bereich des Epithels zu beobachten. Bereits bei Übersichtsvergrößerungen nämlich ist in vielen Fällen RR-positives Material im Interzellularspalt dargestellt.(Abb. 13). Bei höherer Vergrößerung (Abb. 14) läßt sich erkennen, daß dieses darauf beruht, daß die Schlußleistenkomplexe der Peridermschicht weit aufgerissen sind und RR über ca. 500 Å breite Spalten in die tieferen Abschnitte des Interzellularraumes vorgedrungen sind.

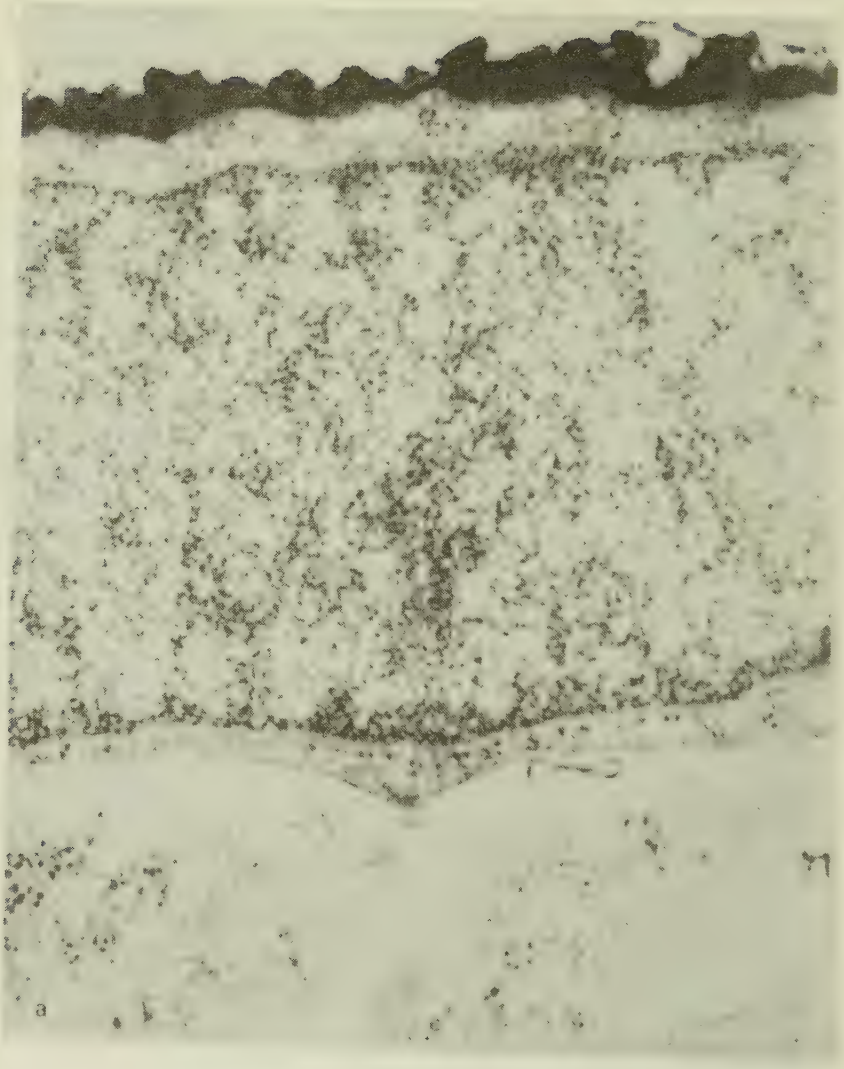
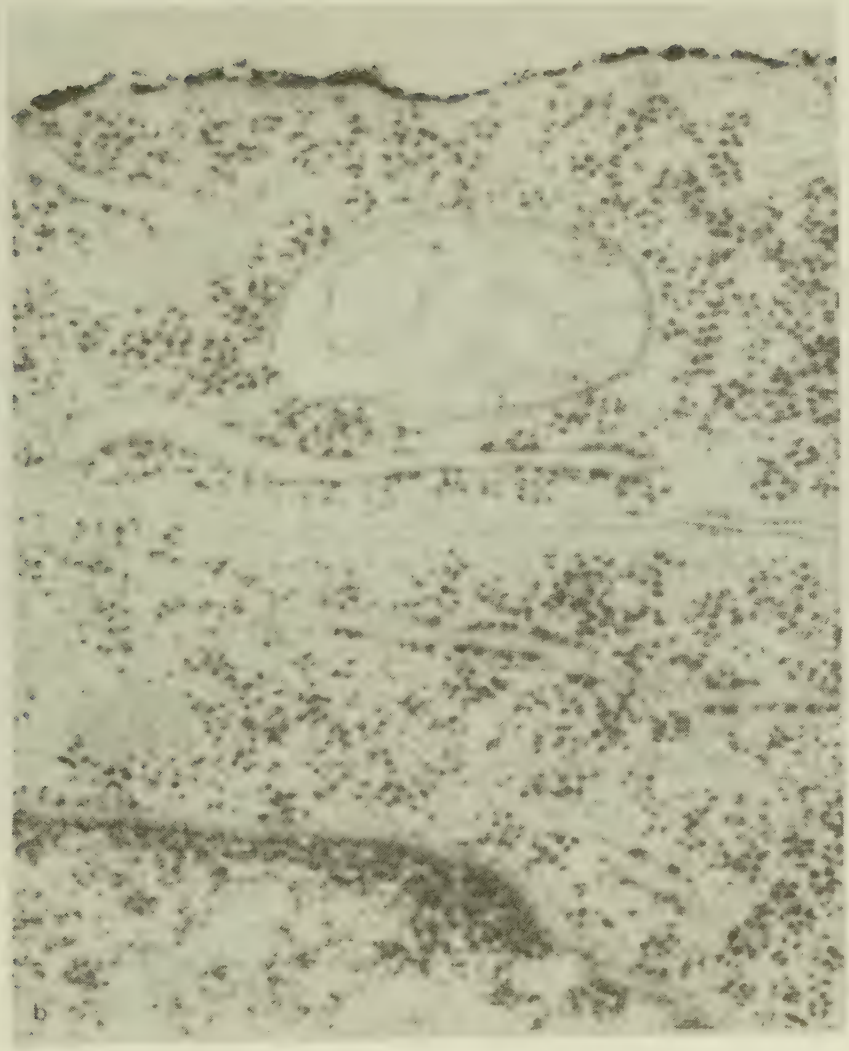


Abb. 12 a und b: Ausschnitte aus dem Periderm eines Kontrollfeten (a) und eines behandelten Keimes (b) nach RR-Inkubation.



Gegenüber dem Normaltier ist der oberflächenfilm des behandelten Tieres erheblich reduziert.
Primärvergrößerung 110.000fach.

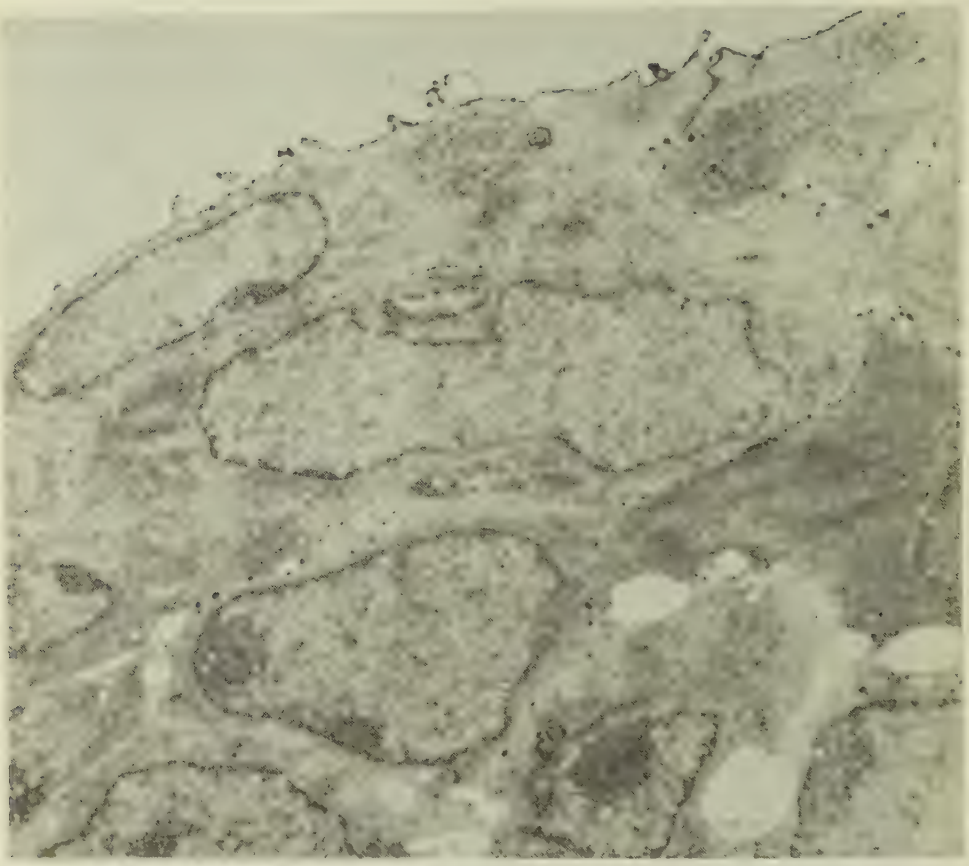


Abb. 13: Übersichtsaufnahme des Gaumenepithels nach RR-Inkubation bei einem behandelten Keim. In allen Interzellularräumen ist RR-positives Material zu erkennen. Primärvergrößerung 4.500fach.

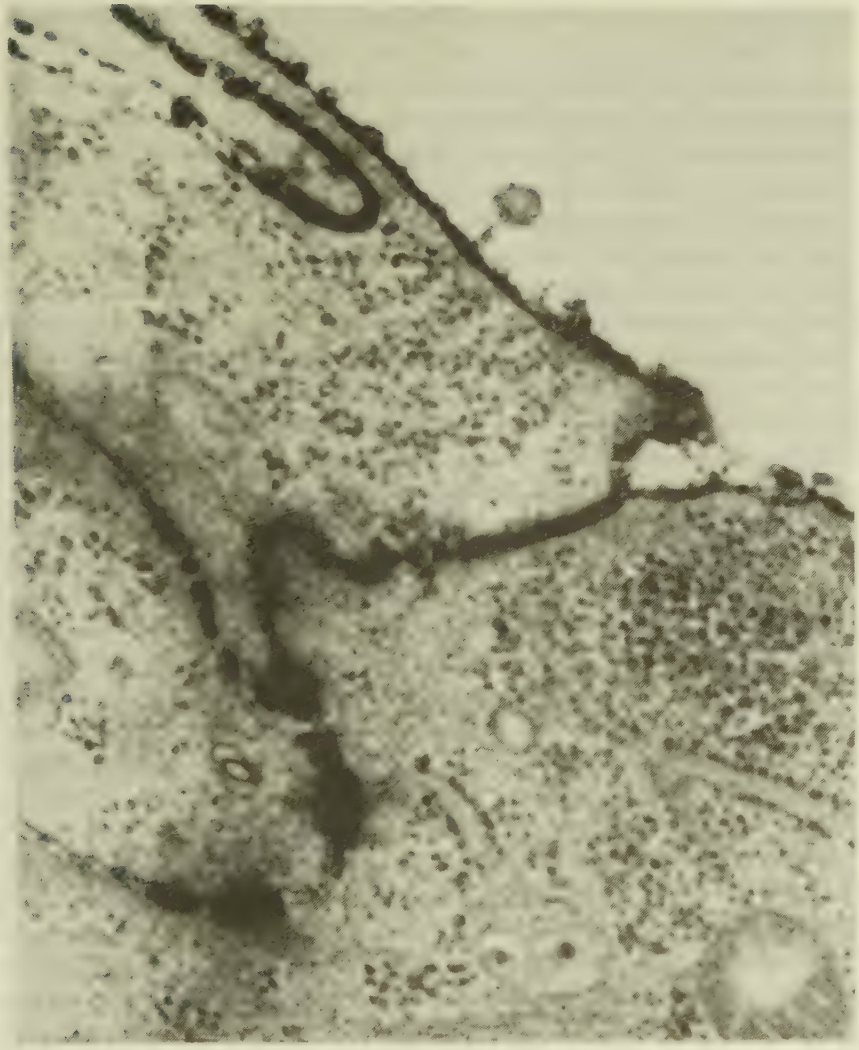


Abb. 14: Apikale Kontaktzone des Periderms bei einem behandelten Keim. Durch den aufgerissenen Schlussleistenkomplex dringt PP in tiefere Abschnitte des Interzellularraumes ein. Primärvergrößerung 71.000fach.

DISKUSSION

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, daß der zum Zeitpunkt des Erwerbs der Fusionsfähigkeit bei Normaltieren auftretende surface coat nach maternaler Vitamin A-Applikation in seiner Kontinuität und Dicke erheblich verändert ist und daß solche Keime regelmäßig Gaumenspalten aufweisen.
Nach der Horizontalisierung und dem ersten noch epithelialen Kontakt der Palatinalfortsätze besteht bereits eine so feste Adhärenz zwischen ihnen (Zeiler et al., 1964; Farbman, 1968), daß sie nur noch schwer voneinander zu trennen sind (De Angelis und Nalbadian, 1968). Das Substrat dieser hohen Adhäsionsfestigkeit ist noch unbekannt; das Vorkommen von Desmosomen, die nur vorübergehend und nur in geringer Zahl auftreten, erscheint als Erklärung hierfür jedoch nicht ausreichend (Farbman, 1969; Hayward, 1969; Smiley und Koch, 1971). Dagegen wird der Ausbildung eines extrazellulären Oberflächenfilms für diese Adhäsionsfestigkeit nach Ansicht verschiedener Autoren eine besondere Bedeutung zugeschrieben (Farbman, 1968; Matthiessen und Anderson, 1972).
Bereits Mato et al. (1967) postulierten eine für die Fusion der Palatinalfortsätze erforderliche celluläre Reaktion, die im Kontaktbereich der Fortsätze und des Nasenseptums abläuft. Lichtmikroskopisch beobachteten sie nämlich einen dünnen Oberflächenbelag im späteren Fusionsbereich, der durch Untersuchungen von Hayward (1969) sowie Nanda und Kelly (1973) bestätigt wurde. Erst von Pratt et al. (1973) konnte mit Hilfe von Concanavalin A auch elektronenmikroskopisch die Existenz eines kohlenhydratreichen Films nachgewiesen werden, der bereits vor der Fusion der Gaumenfortsätze auftritt. Auf die Anhäufung filamentähnlichen Materials an der Spitze der Palatinalfortsätze vor dem Kontakt wiesen auch Waterman et al. (1973) hin.

Die Natur dieses Oberflächenfilms wurde von Greene und Kochhar (1974) sowie Souchon (1975) mit Hilfe der Rutheniumrot-Methode nach Luft (1971 a, b) näher untersucht. Durch Behandlung mit Rutheniumrot (RR) können saure Mukopolysaccharide (MPS) elektronen-

mikroskopisch dargestellt werden (Luft, 1964, 1965).
Obwohl die Reaktion nicht spezifisch und der Reaktionsmechanismus noch weitgehend unbekannt ist, kann RR nach Untersuchungen verschiedener Autoren als Indikator von sauren M P S angesehen werden (Myers et al., 1969; Günther et al., 1972; Merker et al., 1972 u. 1973).
Sowohl Greene und Kochhar (1974) wie auch Souchon (1975) beschrieben unter Verwendung dieser Methode einen RR-positiven Oberflächenfilm auf dem Epithel der Palatinalfortsätze, der etwa 40 Stunden vor der eigentlichen Fusion auftritt. Die Autoren nehmen an, daß der Nachweis dieses surface coat auf dem apikalen Plasmalemm zur Aufhellung des Phänomens beiträgt, das als "acquired potential to fuse" bereits von Pourtois (1966) bei Ratten und von Vargas (1967) bei Mäusen in vitro gezeigt werden konnte. Vargas (1967) z. B. wies nach, daß Explantate von Gaumenfortsätzen nur bei Mäusefeten fusionieren, die älter als 12 Tage sind. Die Fusionspotenz wird bei diesen Tierspezies also erst in den letzten 40 Stunden vor dem Gaumenschluß erreicht. Da der surface coat zu dieser Zeitpunkt erstmals nachzuweisen ist, wird er sowohl von Greene und Kochhar (1974) als auch Souchon (1975) als Ausdruck der morphologischen Differenzierung des Palatinalfortsatzepithels im Sinne seiner Fusionsfähigkeit angesehen und ihm eine wesentliche Rolle beim Gaumenschluß zugeschrieben.

Diese These wird durch die vorliegende Untersuchung unterstützt, da der surface coat bei experimentell verhindertem Gaumenschluß massive Veränderungen aufweist. Nach Einwirkung einer maternalen A-Hypervitaminose ist der surface coat der Peridermschicht der Palatinalfortsätze nämlich entweder völlig verschwunden oder weist einen Verlust seiner Homogenität wie auch seiner absoluten Dicke auf.

Die entscheidende Frage, ob die Palatinalfortsätze der Vitamin A behandelten Feten sich berühren, kann aus der vorliegenden Untersuchung nicht beantwortet werden. Aus der Literatur lassen sich jedoch Anhaltspunkte dafür heranziehen, daß diese Berührung tat-

sächlich erfolgt. Obwohl in den Semidünnschnitten Spalträume zwischen den Gaumenfalten sowohl bei Normaltieren wie bei behandelten Feten zu erkennen sind, scheinen dies vorwiegend Schrumpfungsartefakte zu sein, die im Rahmen der Einbettung auftreten. Verschiedene Autoren konnten nämlich bei Rattenfeten (Wragg, 1971; Wragg et al., 1972) und Mäusekeimen (Greene und Kochhar, 1973a) mit Hilfe einer bestimmten Gefrierschnittechnik nachweisen, daß diese in histologischen Präparaten auftretenden Spalträume in vivo nicht existieren. So gefroren z. B. Greene und Kochhar (1973 a) zunächst die fetalen Köpfe für etwa 20 Sekunden in Hexan bei einer Temperatur von -70° ein; diese gefrorenen Köpfe wurden dann mit einem mittels Kohlensäure gekühlten Messer bei ebenfalls -70°C geschnitten. Dabei konnten die Autoren zeigen, daß bei Mäusefeten, bei denen nach maternaler Cortison-Applikation in hohem Maße Gaumenspalten auftreten, stets eine Berührung der Gaumenfortsätze erfolgt. Gegenüber unbehandelten Keimen wird diese lediglich etwa 12 - 14 Stunden später erreicht. Es ist daher auch bei Vitamin A behandelten Feten, bei denen eine ähnliche zeitliche Verzögerung der Palatogenese zu beobachten war, anzunehmen, daß sich die Palatinalfortsätze tatsächlich berühren. Aufgrund des mangelhaft ausgebildeten surface coat wird aber eine feste epitheliale Adhäsion nicht erreicht.

Neben den Veränderungen des surface coat spielen beim Auftreten von Gaumenspalten auch noch andere, durch die vorliegende Untersuchungsmethode jedoch nur zum Teil erfaßbare Veränderungen eine Rolle. So wird in der Literatur dem Anstieg der Syntheserate von Mukopolysacchariden im palatinalen Mesenchym (Larsson, 1962), Veränderungen im Mesenchymkern (Sweney und Shapiro, 1970) sowie dem epithelialen Zelltod vor dem Kontakt der Fortsätze (Shapiro und Sweney, 1969; Mato et al., 1972) eine wesentliche Rolle bei der Bildung des Gaumens zugeschrieben. Während aus den vorliegenden Befunden quantitative oder qualitative Veränderungen hinsichtlich des epithelialen Zelltodes nicht zu erkennen waren, konnten bei Vitamin A behandelten Feten dagegen andere Veränderungen im Bereich des Epithels beobachtet werden. Es befindet sich bei vielen

Tieren im Zustand der Desintegration, da die Schlußleistenkomplexe in der Peridermschicht häufig aufgerissen waren.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Feinstruktur des Oberflächenfilms und des surface coat der sich entwickelnden Gaumenfortsätze wurde bei Mäusen zwischen dem 14. und 16. Trächtigkeitstag elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei konnte nach Verwenden von Rutheniumrot (RR) ein RR-positiver surface coat beobachtet werden, der die Gaumenfortsätze bis zum Stadium der Fusion vollständig bedeckt. Die Dicke des surface coat wurde mit 600-800 Å bestimmt, wobei keine Dickenunterschiede zwischen dem Apex und der späteren oralen bzw. palatinalen Seite der Fortsätze festgestellt wurden.
Nach s. c. maternaler Applikation von Vitamin A am 12., 13. und 14. Trächtigkeitstag weisen bei Schnittentbindung am 19. Tag alle Feten Gaumenspalten auf.
Bei diesen Feten ist während der Palatogenese der surface coat entweder völlig verschwunden oder in seiner Homogenität und Kontinuität verändert.
Diese Befunde bestätigen die in der Literatur geäußerte Vermutung, daß der surface coat Zeichen der zellulären Differenzierung des Gaumenepithels ist, die dieses zur Fusion befähigt.

LITERATURVERZEICHNIS

Asling, C.W.; Nelson, M.M.; Dougherty, H.L.; Wright, H.V.; Evans, H.M. : The development of cleft palate resulting from maternal pteryglutamic (folic) and defiency during the latter half of gestation in rats. Surg.Gyn.Obst. 111, 19-28 (1960)

Baker, H.; Frank, O. : Clinical Vitaminology. New York: Interscience (1968)

Coleman, R.D. : Development of the rat palate. Anat.Rec. 151, 107-118 (1965)

Dawson, A.B. : A note on the starning of the skeleton of cleared specimes with alizarin red S. Stain Technol. 1, 123 (1926)

De Angelis, V.; Nalbadian, J. : Ultrastructure of mouse and rat palatal processes prior 10 and during secondary palate formation. Archs oral Biol. 13, 601-608 (1968)

Farbman, A.I. : Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos. Develop. Biol. 18, 93-116 (1968)

Farbman, A.I. : The epithelium-connective tissue interface during closure of the secondary palate in rodent embryos. J. dent. Res. 48, (Supply to No 5), 617-623 (1969)

Farquhar, M.G.; Palade, G.E. : Functional complexes in various epithelia. F.Cell Biol 17, 375-421 (1963)

Gal, I.; Sharman, I.M.; Pryse-Davies, J. : Vitamin A in relation to human congenital malformations. Advances in Teratology, Ed. Woollam, D.H.M.

Vol. 5, Academic Press. N.Y., pp. 143-159 (1972)

Giroud, A.; Martinet, M. : Teratogenese parhantes dose de vitamin A en fonction des stades de developpement.

Arch.micr.Morph.exp. 45, 77-98 (1956)

Giroud, A.; Gounelle, H.; Martinet, M. : Donnés quantitatives sur le taux de la vitamin A chez les rats lors d'experiences de teratogenese par hypervitaminose.

A.Bull. Soc.Chim. biol. 39, 331-336 (1957)

Greene, R.M.; Kochhar, D.M. : Palata closure in the mouse as demonstrated in frozen sections (I).

Amer.J.Anat. 137/4, 477-482 (1973)

Greene, R.M.; Kochhar, D.M. : Spatial relations in the oral cavity of cortisone-treated mouse fetuses during the time of secondary palate closure.

Terat. 8, 153-162 (1973)

Greene, R.M.; Kochhar, D.M. : Surface coat on the epithelium of developing palatine shelves in the mouse as revealed by electron microscopy.

J.Embryol.exp.Morph. 31/3, 683-692 (1974)

Günther, Th.; Merker, H.J.; Carsten, P.M. : Das Verhalten der kollagenen Fibrillen und der GAG im Corium von Ratten verschiedenen Alters unter experimentellen Bedingungen.

Zitiert bei Merker und Günther (1973)

Gustavson, G.F.; Pihl, E. : Staining of mast cells acid glycosaminoglycans in ultrathin sections by rutheniumred.

Nature (Lond.) 216, 697-698 (1967)

Hayward, A.F. : Ultrastructural changes in the epithelium during fusion of the palatal processes in rats.
Arch.oral.Biol. 14, 661-678 (1969)

Ito, S.; Winchester, R.J. : The fine structure of the gastric mucosa in the rat.
J.Cell. Biol. 16, 541-577 (1963)

Kalter, H. : The teratogenic effects of hypervitaminosis A upon the face and mouth of inbred mice.
Ann.N.Y. Acad. Sci. 85, 42-55 (1960)

Kalter, H.; Warkany, J. : Experimental production of congenital malformations in mammals by metabolic procedure.
Physiol.Rev. 39, 69-115 (1959)

Kochhar, D.M.; Dingle, J.T.; Lucy, J.A. : The effects of vitamin A (Retinol) on cell growth and incorporation of labelled glucosamine and proline by mouse fibroblasts in culture.
Exp.Cell.Res. 52, 591-601 (1968)

Larsson, K.S. : Closure of the secondary palate and its relation to sulphomucopolysaccharides.
Acta odont.scand. 20, (Supply to No 31) 1-35 (1962)

Lazzaro, C. : Sul meccanismo di chiusura del palato secondairo.
Monit.Zool.Ital. 51, 249-273 (1940)

Luft, J.H. : Electron microscopy of cell extraneous coats as revealed by ruthenium red staining.
J.Cell Biol. 23, 54 A (1964)

Luft, J.H. : The fine structure of hyaline cartilage matrix following ruthenium red fixation and staining.
J.Cell Biol. 27, 61 A (1965)

Luft, J.H. : Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of aceion.
Anat.Rec. 171, 347-368 (1971 a)

Luft, J.H. : Ruthenium red and violet. II. Fine structural localisation in animal tissues.
Anat.Rec. 171, 369-416 (1971 b)

Mato, M.; Aikawa, E.; Katahisa, M. : Studies on cell-reaction of the nasal epithelium during fusion to palatine shelves.
Anat.Anz. 121, 504-517 (1967)

Mato, M.; Smiley, G.R.; Dixon, A.D. : Epithelial changes in the presumptive regions of fusion during secondary palate formation.
J.dent.Res. 51, 1451-1456 (1972)

Matthiessen, M.; ANderson, H. : Desintegration of the junctional epithelium of human fetal hard palate.
Z. Anat.Entw.Gesch. 137, 153-169 (1972)

Merker, H.J.; Struwe, K. : Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Sekretion der bindegewebigen Interzellularsubstanz.
Z.Zellforsch. 115, 212-225 (1971)

Merker, H.J.; Surisch, W.; Günther, Th. : Das elektronenmikroskopische Bild des Kollagens der Seeanemone (mebridium dianthus).
Zitiert bei Merker und Günther (1973)

Merker, H.J.; Günther, Th. : Die elektronenmikroskopische Darstellung von Glykosaminoglykanen im Gewebe mit Rutheniumrot.
Histochemie 34, 293-303 (1973)

Mollenhauer, H.H. : Poststaining sections for electron microscopy.
Stain.Technol. 49, 305-308 (1974)

Myers, D.B.; Highton, T.C.; Ryans, D.G. : Acid mucopolysaccharides closely associated with collagen fibrils in normal human synovium.
J.Ultrastruct.Res. 28, 203-213 (1969)

Nanda, R.; Kelly, W.M. : An ultrastructural study of palatal fusion in rat embryos.
J.dent.Res. 52, 11 (1973)

Peter, K. : Die Entwicklung des Säugetiergaumens.
Ergebn.Anat.Entwicklungsgesch. 25, 488-564 (1924)

Pilotti, G.; Scorta, A. : Mincova Ginecologica 17, 1103 (1965)
Zitiert bei Wild et al. 1974

Pourtois, M. : Onset of the acquired potentiality for fusion in the palatal shelves of rats.
J.Embryol.exp.Morph. 16/1, 171-182 (1966)

Pourtois, M. : La fusion des cretes palatines et son altération par quelques agents teratogenes.
Arch.Biol. (Liège) 79/1, 165-179 (1968)

Pourtois, M. : Influence of cleft lip upon palate closure in A/Jax mice.
Cleft Palate J. 4, 120-123 (1967)

Pratt, R.M.; Gibson, W.A.; Hassel, J.R. : Concanavalin A binding to the secondary palate of embryonic rat. J.dent.Res. 52, 111 (1973)

Reynolds, E.S. : The use of lead citrat at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J.Cell Biol. 17, 208-213 (1963)

Russel, R.M.; Bagheri, S.A.; Boyer, J.C. : The hepatic lesion of hypervitaminosis A - a unique pattern of hepatic fibrosis with portal hypertension and ascites. Gastroenterology 65, 544-568 (1973)

Schlüter, G. : Elektronenmikroskopische und experimentelle Untersuchungen über die Struktur und Funktion des visceralen Entoderms bei Mäuseembryonen. Habilitationsschrift, Bonn 1974

Shapiro, B.L.; Sweney, L. : Electron microscopic and histochemical examination of oral epithelial-mesenchymal interactions (programmed cell death). J.dent.Res. 48 (Supply to No 5), 652-659 (1969)

Smiley, G.R.; Koch, W.E. : Fine structure of mouse secondary palate development in vitro. J.dent.Res. 50, 1671-1677 (1971)

Souchon, R. : Surface coat of the palatal shelf epithelium during palatogenesis in mouse embryos. Anat.Embryol. 147, 133-142 (1975)

Sweney, L.R.; Shapiro, B.L. : Histogenesis of swiss white mouse secondary palate from nine and one-half days to fifteen and one-half days in utero. J.Morph. 130, 435-449 (1970)

Vargas, V.I. : Palatal fusion in vitro in the mouse. Arch.oral Biol. 12, 1283-1288 (1967)

Walker, B.E.; Fraser, F.C. : Closure of the secondary palate in three strains of mice. J.Embryol.exp.Morph. 4/2, 176-189 (1956)

Waterman, R.E.; Ross, L.E.; Meller, S.M. : Alterations in the epithelial surface of A/Jax mouse palatal shelves prior to and during palatal fusion: ascanning election microscopic study. Anat.Rec. 176, 361-376 (1973)

Wild, J.; Schorah, C.J.; Smithells, R.W. : Vit. A, pregnancy, and oral contraceptives. Brit.med.J. 1, 57-59 (1974)

Wollam, D.H.M.; Miller, J.W. : Influence of 4-methyl-2-thiouracil on the teratogenic activity of hypervitaminosis A. Nature 181, 922 (1958)

Wollam, D.H.M.; Miller, J.W. : The modifications of the activity of certain agents exerting a deleterious effect on the development of mammalian embryo. In: Ciba Foundation Symposium on Congenital Malformation (Ed. G.E.W. Woloenholme and M.O'Connor), pp, 158-172 London, Churchill (1960)

Wragg, L.E. : Facial growth and secondary palate formation. J.Dent.Res. 50, (Suppl.) 1508-1509 (Abstract) (1971)

Wragg, L.E.;
Diewert, V.M.;
Klein, M. :

Spatial relations in the oral cavity and the mechanism of secondary palate closure in the rat.

Arch.Oral Biol. 17, 683-690 (1972)

Zeiler, K.B.;
Weinstein, S.;
Gibson, R.D. :

A study of the morphology and the time of closure of the palate in the albino rat.

Arch. Oral Biol. 9, 545-554 (1964)

Herrn Professor Dr. G. Schlüter möchte ich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung danken.

Auch Herrn G. Kruse sei hiermit für die freundliche Hilfe mein herzlicher Dank ausgesprochen.

LEBENSLAUF

Am 10. September 1948 wurde ich, Rainer Michael Aichinger-Hinterhofer, als zweites Kind des Dr. Ing. Heinrich Aichinger-Hinterhofer und seiner Ehefrau Hannelore, geb. Knepper, in Bardenberg/Aachen geboren.
In Dortmund besuchte ich die Grundschule und das altsprachliche Stadtgymnasium. Nach der Reifeprüfung im Dezember 1968 immatrikulierte ich mich im April 1969 an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule in Aachen für das Studium der Medizin. Nach der ärztlichen Vorprüfung im Oktober 1971 setzte ich das Studium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn fort und begann dort zugleich das Studium der Zahnmedizin. Nach der zahnärztlichen Vorprüfung im September 1972 legte ich im Januar 1975 die ärztliche und im April des gleichen Jahres die zahnärztliche Prüfung ab.
Als Medizinalassistent war ich an dem St.-Barbara-Hospital Gladbeck tätig, anschließend arbeitete ich als wissenschaftlicher Angestellter am Anatomischen Institut der Universität Bonn.
Die Promotion zum Dr. med. erfolgte im Februar 1976.
Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistent in der I. Med.Klinik der MHL Lübeck.